

# VU Research Portal

## Impaired cardiac thyroid hormone signaling during heart failure

Pol, C.J.

2012

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Pol, C. J. (2012). *Impaired cardiac thyroid hormone signaling during heart failure: The role of type III deiodinase*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# Samenvatting

## Summary in Dutch

Een rol voor verminderde schildklierhormoonsignaaltransductie tijdens de ontwikkeling van hartfalen is al lange tijd gesuggereerd vanwege overeenkomsten in cardiale genexpressie tijdens hypothyreoïdie en pathologische remodellering tijdens hartziekten. De schildklier produceert vooral het prohormoon thyroxine ( $T_4$ ) dat vier jodiumatomen bevat, maar het produceert ook de actieve vorm triiodothyronine ( $T_3$ ) dat drie jodiumatomen bevat.  $T_3$  is de meer actieve vorm van schildklierhormoon door een veel hogere bindingsactiviteit voor schildklierhormoonreceptoren. Bloedspiegels van  $T_3$  worden vooral bepaald door perifere conversie van  $T_4$  door dejodering. Dejodases zijn de enzymen die schildklierhormoon kunnen activeren en inactiveren door verwijdering van een jodiumatoom. Het onderzoek in dit proefschrift is vooral gericht op het schildklierhormoon inactiverende type III dejodase (DIO3) dat tot expressie komt in placenta en de meeste foetale weefsels, maar nagenoeg afwezig is in volwassen weefsels.

In diverse situaties is er weefsel-specifieke regulatie van schildklierhormoon activiteit door dejodases gevonden. Naast de bekende inductie van het schildklierhormoon activerende type II dejodase in bruin vet bij blootstelling aan kou, is gereguleerde expressie van type II dejodase en DIO3 aangetoond tijdens de ontwikkeling van de hypothalamus-hypofyse-schildklier as, het oog, het auditieve systeem, en de hersenen. Behalve een rol tijdens fysiologische adaptatie en ontwikkeling is weefsel-specifieke regulatie van schildklierhormoon ook gevonden bij ziekte, zoals bij ontstekingen, levensbedreigende ziekte, weefselbeschadiging en kanker. Dit heeft geleid tot de huidige opvatting dat de lokale regulatie van schildklierhormoonactiviteit door gereguleerde expressie van dejodases van cruciaal belang is in de ontwikkeling en fysiologische adaptatie, alsmede in pathofysiologie. Een recent voorbeeld van dit laatste is de onverwachte inductie van DIO3 in het hart tijdens cardiale remodellering en hartfalen, die is gevonden in verschillende diermodellen van chronische overbelasting van het hart. Er is echter nog veel onbekend omtrent deze vinding en de implicaties ervan voor pathologische remodellering van het hart.

Het werk beschreven in dit proefschrift is uitgevoerd om meer inzicht te krijgen in inductie van DIO3 en de consequenties ervan tijdens cardiale remodelling t.g.v myocardinfarct. De volgende vragen zijn behandeld:

1. Wordt DIO3 ook geïnduceerd in een muizenmodel van myocardinfarct (MI)?
2. Wat is de cellulaire oorsprong van inductie van DIO3?
3. Wat zijn de gevolgen van inductie van DIO3 voor schildklierhormoonmetabolisme en schildklierhormoon-afhankelijke transcriptieactiviteit?
4. Wat is het tijdsverloop van expressie van DIO3 in het proces van linkerventrikel remodelling?
5. Hoe wordt de inductie van DIO3 gereguleerd?
6. Is DIO3 betrokken bij de door inspanningstraining geïnduceerde verbetering van hartfunctie na MI?
7. Is DIO3 ook aanwezig bij patiënten met eindstadium hartfalen?

Dit hoofdstuk is een samenvatting van de resultaten van deze studies.

De gerapporteerde inductie van DIO3 in het hart in verschillende modellen van cardiale remodelling en hartfalen impliceert een effect van DIO3 op de schildklierhormoonsignaaltransductie. Alhoewel de bepaling van weefselspiegels van  $T_3$  een duidelijke indicatie kan geven over het effect van expressie van DIO3, geeft het geen informatie over de nucleaire beschikbaarheid van  $T_3$  en daarmee de fysiologische relevantie. Hierin wordt wel inzicht verkregen wanneer de  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit wordt gemeten. Dit is eerder gedaan in een rattenmodel van rechterventrikel hypertrofie en falen met behulp van een *in vivo*  $T_3$ -transcriptie assay. In **Hoofdstuk 2** is deze methode verfijnd en gevalideerd voor de muis. Een  $T_3$ -responsief Firefly luciferase plasmide en een Renilla luciferase plasmide voor normalisatie werden gecombineerd met het doel om de nauwkeurigheid van de meting te vergroten. Inderdaad toonden uitgebreide *in vitro* analyse en vergelijking van *in vivo* data met eerdere resultaten in rattenhart een aanzienlijke verhoging van de reproduceerbaarheid aan bij gebruik van het gecombineerde plasmide in vergelijking met de afzonderlijke plasmiden. Meting van de  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit door middel van injectie van het plasmide in de linkerventrikelwand van hypothyreote, euthyreote, en  $T_3$ -behandelde hypothyreote muizen toonde een sterke afhankelijkheid aan van de genormaliseerde Firefly luciferase-activiteit van  $T_3$  spiegels in het bloed.

Ontwikkeling van deze techniek in de muis geeft de mogelijkheid om de fysiologische relevantie van de verwachte hypothyreoidie van het hart na MI te onderzoeken. Meting van  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit omvat ook de mogelijke effecten van andere factoren die schildklierhormoonsignaaltransductie beïnvloeden. Bovendien nemen alleen cardiomyocyten in het hart het expressieplasmide op, waardoor met deze methode  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit nauwkeurig kan worden bepaald in de cardiomyocyt *in vivo*.

In **Hoofdstuk 3** zijn muizen bestudeerd op 1, 4, en 8 weken na inductie van MI om het tijdsverloop van cardiale remodelering en veranderde schildklierhormoonsignaaltransductie na een MI vast te stellen. Pathologische remodelering van het niet-geïnfarceerde deel van het linkerventrikel bleek uit cardiomyocyt hypertrofie, interstitiële fibrose en vermindering van contractiliteit. Deze veranderingen waren vanaf de eerste week al maximaal en stabiel, net zoals de mate van dilatatie van het linkerventrikel. Er is een sterke inductie van DIO3 activiteit gevonden in het niet-geïnfarceerde deel van het linkerventrikel, die eveneens stabiel was in de onderzochte periode.  $T_4$  spiegels in het bloed waren tijdelijk verlaagd op 1 week na MI, maar  $T_3$  spiegels waren normaal. De hoge DIO3 activiteit was geassocieerd met verhoogde *Dio3* mRNA expressie op 1 maar niet op 4 en 8 weken na MI. Deze verrassende bevinding suggereert dat naast de goed gedocumenteerde transcriptionele regulatie, DIO3 expressie eveneens gereguleerd is op het niveau van translatie-efficiëntie en/of eiwitstabiliteit. Met immunohistochemie werd aangetoond dat DIO3 eiwit zich in cardiomyocyten bevindt na MI. Er werden DIO3 expresserende cardiomyocyten in het gehele niet-geïnfarceerde deel van het linkerventrikel gevonden met een heterogene distributie. Met behulp van de DNA-injectie methode uit **Hoofdstuk 2** is  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit na MI gemeten. Er werd een daling van de activiteit van bijna 50% gevonden in MI-muizen in vergelijking met controle muizen, en dit was geassocieerd met een 50% afname van de  $T_3$  spiegels in linkerventrikel weefsel. Uit deze studie blijkt dat pathologische cardiale remodelering na MI in de muis leidt tot een sterke en stabiele inductie van DIO3 activiteit in cardiomyocyten en tot een lokale hypothyreote conditie.

In **Hoofdstuk 4** is de hypothese getest dat inspanningstraining na MI een positief effect heeft op de hartfunctie doordat het de verminderde schildklierhormoonsignaaltransductie opheft door verlaging van de DIO3 expressie. Er is klinisch bewijs dat inspanningstraining bij hartfalen een gunstig effect heeft op progressie van de ziekte en overleving. Versterking van schildklierhormoonsignaaltransductie kan één van de mechanismen zijn die betrokken is bij deze gunstige effecten aangezien inspanningstraining de bij hartfalen verlaagde schildklierhormoonsignaaltransductie kan verhogen. Daarnaast is schildklierhormoon in staat om fysiologische hypertrofie te induceren. In tegenstelling tot eerdere studies heeft inspanningstraining van 1 tot 8 weken na MI niet geleid tot een verbeterde hartfunctie in deze studie, noch tot verandering van DIO3 expressie. Hierdoor is een conclusie met betrekking tot een verband tussen verbeterde schildklierhormoonsignaaltransductie en het veronderstelde gunstige effect van inspanningstraining op hartfunctie niet mogelijk.

Op welk tijdstip tijdens de cardiale remodelering de DIO3 expressie wordt geïnduceerd en hoe deze wordt gereguleerd is behandeld in **Hoofdstuk 5**. Daarvoor werden controle en MI muizen geanalyseerd op 3, 5, en 7 dagen na operatie met behulp van echocardiografie,

drukmeting, en weefsel analyse. Op alle tijdstippen was er dilatatie van het linkerventrikel en verminderde contractiliteit na MI. DIO3 expressie was sterk verhoogd in het linkerventrikel van MI-muizen op dag 3, gevolgd door een tijdelijke verlaging op dag 5 en uiteindelijk weer hoge expressie op dag 7. De kennelijk bifasische inductie van DIO3 wordt mogelijk veroorzaakt door een additioneel effect gerelateerd aan operatiestress. Dit laatste effect, dat optrad in de controlemuizen, was snel en kortdurend en alleen zichtbaar op dag 3. Het lijkt transcriptioneel gereguleerd te zijn aangezien *Dio3* mRNA expressie hetzelfde patroon vertoonde. Mechanismen die verband houden met ontstekingsreacties en cytokines zijn hier mogelijk verantwoordelijk voor. Deze mechanismen worden ook verondersteld verantwoordelijk te zijn voor de veranderingen in perifere schildklierhormoonmetabolisme die leiden tot een tijdelijke verlaging in bloedspiegels van  $T_4$  en  $T_3$  tijdens acute stress, wat wij ook hebben gevonden in zowel de MI en controle muizen.

Potentiële kandidaten voor de transcriptionele regulatie van muis *Dio3* zijn o.a.: hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), mitogen-activated protein kinases (MAPK) en sonic hedgehog (Shh). Van deze factoren is een kleine opregulatie gevonden van mRNA expressie van TGF $\beta$  en van de totale en gefosforyleerde p38 MAPK eiwitexpressie, wat de betrokkenheid van de TGF $\beta$ -TAK1-p38 route in de inductie van DIO3 tijdens de eerste week na het MI suggereert. Dit zijn de eerste data die gelijktijdige activering van TGF $\beta$  en p38 en inductie van DIO3 expressie tijdens cardiale remodelering laten zien. Met immunohistochemie werd expressie van DIO3 door het hele remodelerende deel van het hart gevonden, maar zeker niet in alle cardiomyocyten. Deze heterogeniteit is een aannemelijke verklaring voor de ondervonden moeilijkheid om expressie van DIO3 te correleren aan potentiële regulerende factoren bij het analyseren van weefselhomogenaten. Deze homogenaten bevatten ook cardiomyocyten zonder expressie van DIO3 en andere celtypen zoals, fibroblasten, endotheelcellen en vasculaire gladde spiercellen. Door dit 'verdunningsseffect' hebben we misschien ook geen veranderingen kunnen detecteren in de signaaltransductie van Shh in het linkerventrikel na MI, terwijl anderen dit wel hebben gevonden. Ook moet in acht worden genomen dat de factoren die in deze studies zijn onderzocht allemaal in staat zijn (synergetisch) transcriptie van DIO3 te stimuleren. Relatief kleine veranderingen in de individuele signaaltransductie kunnen dus resulteren in een significant effect.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** werd in eerste instantie geen verandering in expressie van HIF-1 $\alpha$  na MI gevonden. In **Hoofdstuk 6** werd de meer gevoelige methode van analyse van transcriptieactiviteit d.m.v. DNA injectie van **Hoofdstuk 2** gebruikt om activiteit van HIF-1 $\alpha$  na MI verder te analyseren. Met deze methode is ook de *Dio3*-promotoractiviteit onderzocht.

Eerder is een directe interactie tussen HIF-1 $\alpha$  en de humane *DIO3* promotor aangetoond. *In vitro* analyse van de muizen *Dio3* promotor in de huidige studie impliceerde ook een rol

voor HIF-1 $\alpha$  in de regulatie van transcriptie van *Dio3*. Niettemin leidde MI niet tot een verhoogde transcriptionele activiteit van de *Dio3* promotor *in vivo*, ondanks een verhoogde mRNA expressie van *Dio3*. Verhoging van *Dio3* mRNA kan ook op een andere manier dan via toegenomen gentranscriptie tot stand komen, maar methodologische beperkingen zijn een aannemelijkere verklaring voor het ontbreken van een verhoogde transcriptionele activiteit van de *Dio3* promotor na MI *in vivo*. Een expressieplasmide met slechts een deel van de *Dio3* promotor is niet geheel vergelijkbaar met de situatie *in vivo* waarin 'enhancer' activiteit en regulatie over grote afstand mogelijk is. Bovendien kan ook hier heterogeniteit van expressie van DIO3 een rol spelen.

Anderzijds werd met *in vivo* transfectie van een reporterplasmide met HIF1-respons-elementen een drievoudige toename van HIF-1 $\alpha$ -afhankelijke transcriptieactiviteit in het niet-geïnfarceerde deel van het linkerventrikel op 5 dagen na MI gevonden. Deze activiteit van HIF-1 $\alpha$ -signaaltransductie na MI correleerde significant met de mate van cardiale remodelering (linkerventrikel dilatatie) en verminderde hartfunctie (fractionele verkorting). Bovendien was de correlatie tussen HIF-1 $\alpha$  afhankelijke transcriptie en *Dio3* mRNA expressie ook significant. Al met al zijn dit sterke aanwijzingen dat HIF-1 $\alpha$  betrokken is bij de inductie van DIO3 na MI. Immunohistochemische lokalisatie van HIF-1 $\alpha$  en DIO3 in individuele cardiomyocyten is nodig ter ondersteuning van de veronderstelde regulatie van DIO3 door HIF-1 $\alpha$ .

In **Hoofdstuk 7** wordt voor het eerst aangetoond dat DIO3 ook wordt geïnduceerd in het falende hart van patiënten met ischemische hartziekte. Hiervoor is expressie van DIO3 geanalyseerd in paraffinecoupes van weefselmicroarrays met behulp van immunohistochemie. Deze weefselmicroarrays zijn opgebouwd uit linkerventrikelweefsel van geëxplanteerde harten van patiënten met eindstadium hartfalen en van ongebruikte donorharten. Terwijl weinig of geen expressie van DIO3 werd gevonden in het merendeel van het donorweefsel werd er matige tot zeer hoge expressie van DIO3 gevonden in het merendeel van het patiëntenweefsel. Net als in de muis werd er geen DIO3 waargenomen in andere cellen dan cardiomyocyten. Hoewel in sommige weefselcoupes een heterogeen patroon van expressie van DIO3 werd gevonden, zoals reeds werd waargenomen in muizen, was er in de meerderheid van de positieve ISHD weefselcoupes hoge expressie van DIO3 in alle cardiomyocyten.

Al met al wijst de sterke inductie van expressie van DIO3 aanwezig tijdens ischemische hartziekte erop dat de DIO3-afhankelijke lokale hypothyreote conditie van het hart gevonden in het muizenmodel van MI (**Hoofdstuk 3**) ook van toepassing kan zijn op de humane situatie en mogelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van hartfalen.

## Slotopmerkingen

Inductie van cardiale expressie van DIO3 is gerapporteerd in verschillende diersmodellen met pathologische remodelering door drukoverbelasting of na MI, en in mensen met ischemische hartziekte. De verkregen gegevens wijzen erop dat de inductie een snelle reactie is op drukoverbelasting en dat DIO3 activiteit aanwezig blijft in het remodelerende hart. Bovendien is DIO3 activiteit geassocieerd met een verwachte daling van weefselspiegel van  $T_3$  en een gelijktijdige vermindering van de  $T_3$ -afhankelijke transcriptieactiviteit.

De verminderde schildklierhormoonsignaaltransductie begunstigt een hypothyreoïd fenotype, dat onder andere gekenmerkt wordt door een lagere energieomzetting en tragere contractie en relaxatie. Verminderen van de energieomzetting in cardiomyocyten die blootgesteld worden aan stress door inductie van DIO3, is in overeenstemming met de adaptieve effecten van HIF-1-siginaaltransductie, die een belangrijke regulator van expressie van DIO3 lijkt te zijn. In tegenstelling tot extracellulair geactiveerde siginaaltransductiecascades of globale toename van de wandspanning, zou celspecifieke HIF-1-siginaaltransductie de expressie van DIO3 beperken tot de cellen die baat hebben bij een verlaagde energie-omzetting. Het gemengde patroon van DIO3-positieve en -negatieve cardiomyocyten, dat in het linkerventrikel na MI in onze studie gevonden is, lijkt een celspecifieke in plaats van een globale inductie van expressie van DIO3 te ondersteunen.

De adaptieve respons kan echter een onderdeel van het probleem worden. Vooral wanneer stimulatie van DIO3 wordt versterkt door andere factoren die betrokken zijn bij pathologische remodelering, zoals TGF $\beta$ - en MAPK-siginaaltransductie, kan de afname in cellulaire  $T_3$  spiegels een groter effect hebben op de expressie van  $T_3$ -afhankelijke genen die betrokken zijn bij de ontwikkeling van contractiele disfunctie, zoals de MHC isovormen en SERCA2a. Hiermee zou het aanvankelijk adaptieve effect van DIO3 activiteit uiteindelijk bij kunnen dragen aan het ontstaan van hartfalen.